

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/019760

International filing date: 24 December 2004 (24.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2003-430492  
Filing date: 25 December 2003 (25.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 17 February 2005 (17.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

24.12.2004

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 3 年 1 2 月 2 5 日  
Date of Application:

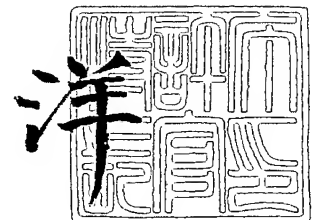
出 願 番 号            特 願 2 0 0 3 - 4 3 0 4 9 2  
Application Number:  
[ST. 10/C]:            [ J P 2 0 0 3 - 4 3 0 4 9 2 ]

出   願   人            高 見   佳 宏  
Applicant(s):

2 0 0 5 年   2 月   3 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 I-TKM-2  
【提出日】 平成15年12月25日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 A61L  
【発明者】  
    【住所又は居所】 東京都文京区本郷 3 丁目 4 3 番 1 6 号成田ビル 5 階 株式会社ビーシーエス内  
    【氏名】 山口 亮  
【発明者】  
    【住所又は居所】 東京都三鷹市新川 6 - 2 0 - 2 杏林大学医学部形成外科内  
    【氏名】 高見 佳宏  
【特許出願人】  
    【識別番号】 502344086  
    【氏名又は名称】 高見 佳宏  
【代理人】  
    【識別番号】 100083806  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 三好 秀和  
    【電話番号】 03-3504-3075  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100068342  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 三好 保男  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100100712  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 岩▲崎▼ 幸邦  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100087365  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 栗原 彰  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100100929  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 川又 澄雄  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100095500  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 伊藤 正和  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100101247  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 高橋 俊一  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100098327  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 高松 俊雄

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 001982

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 特許請求の範囲 1

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

採取した皮膚を凍結融解した後、高張食塩水で処理することにより表皮と真皮とに分離する工程、及び、分離した表皮を等張緩衝液で洗浄する工程を含むことを特徴とする皮膚の分離無細胞化方法。

**【請求項 2】**

採取した皮膚を凍結融解した後、高張食塩水で処理することにより表皮と真皮とに分離する工程、及び、分離した表皮を等張緩衝液で洗浄する工程により分離し、無細胞化したことを特徴とする無細胞化真皮マトリックス。

**【請求項 3】**

採取した皮膚を凍結融解した後、高張食塩水で処理することにより表皮と真皮とに分離する工程、及び、分離した表皮を等張緩衝液で洗浄する工程を含むことを特徴とする無細胞化真皮マトリックスの製造方法。

**【請求項 4】**

請求項 2 に記載の無細胞化真皮マトリックスを担体とする複合培養皮膚。

**【請求項 5】**

請求項 2 に記載の無細胞化真皮マトリックスを担体とする複合培養上皮。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】皮膚の分離無細胞化方法、無細胞化真皮マトリックス及びその製造方法並びに無細胞化真皮マトリックスを用いた複合培養皮膚

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、採取した皮膚を分離無細胞化する方法及び当該分離無細胞化方法により得られる無細胞化真皮マトリックス、或いは当該分離無細胞化方法を利用した無細胞化真皮マトリックスの製造方法に関し、また当該無細胞化真皮マトリックスを担体とした複合培養上皮及び皮膚に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

培養皮膚は、1975年にRheinwaldとGreenによって表面細胞をシート状に培養する方法が開発されて以来（例えば、非特許文献1参照。）、熱傷や創傷などの欠損した皮膚の再建手段として研究が進められてきた。Greenらの培養表皮シートは、1981年にConnorらにより初めて臨床に適用された培養皮膚である（例えば、非特許文献2参照。）。しかし、真皮成分を含まないことから全層皮膚欠損創では滲出液や細菌の汚染により生着率が悪く、生着しても水疱や潰瘍を生じやすいことが大きな問題点となっている（例えば、非特許文献3参照。）。そのため、培養皮膚における真皮成分の重要性が認識され、今日まで様々な真皮材料を細胞の足場（担体）とした培養皮膚が開発されてきた。

## 【0003】

現在、表皮細胞を組み込んだ培養皮膚の主な担体には、バイクリル（Vicryl：登録商標）等の生体吸収性の合成高分子や（例えば、非特許文献4参照。）、コラーゲングル（例えば、非特許文献5参照。）、C-GAG等のコラーゲンスポンジ（例えば、非特許文献6参照。）といった、生体由来材料から成る人工真皮、さらに生体皮膚組織由来の無細胞真皮マトリックス（Acellular Dermal Matrix：ADM）（例えば、非特許文献7、8参照。）などが使用されている。バイクリル（登録商標）とは、グリコール酸と乳酸とを9：1の割合で共重合した生体吸収性合成高分子（ポリグラクチン-910）であり、吸収性のある縫合糸やネットとして臨床使用されている。このポリグラクチンを担体として線維芽細胞を組み込んだ人工真皮が、Derma graft（登録商標）であり、HansbroughらはDerma graft（登録商標）に表皮細胞を組み込んだ複合型培養皮膚を作製し、報告した。また、C-GAG（Collagen-Glycosaminoglycan）とは、1980年にYannasらが、コラーゲンとグリコサミノグリカンの一種であるコンドロイチン6硫酸を共重合したコラーゲンスポンジとして開発したものである。1988年にBoyceらはC-GAGに表皮細胞を播種した培養皮膚を作製し、報告した。

## 【0004】

上記の担体のなかでも、ADMは生理的な真皮構造を有することから、培養皮膚の担体として用いた場合、最も生体に近似した皮膚モデルとなり得る。しかし、ADMはもともと植皮あるいは培養表皮との同時移植において、欠損した真皮部分を再構築させるための代用真皮として開発されたものである。これを担体とした培養皮膚については現在様々な研究が試みられているが、基礎研究段階であることからヒトへの臨床報告はほとんどなく、実用化には至っていない。その基礎研究のひとつとして、同種皮膚の無細胞化法が挙げられる。同種皮膚の無細胞化にはさらにいくつかの方法があり、表皮基底膜をはじめとして、真皮内に含まれる種々の細胞外マトリックスを温存させることが可能である。しかし、無細胞化方法によって基底膜成分の温存程度が異なり、それが培養細胞にどの程度の影響を与えているかは不明な点が多い。

## 【0005】

同種皮膚の様々な分離無細胞化方法のなかでも、1M塩化ナトリウム処理にて真皮層から表皮層を剥離する方法が、最も基底膜の温存程度が良好であることが知られている。し

かし、同種皮膚の個体差により、1 M塩化ナトリウム処理のみでは、表皮層の剥離が困難なことがあり、また処理時間も18～24時間と長い。さらに真皮マトリックス内を完全に無細胞化するためには、真皮内の残存細胞を除去する必要がある。真皮内細胞の除去方法には、界面活性剤であるSDSなどを用いることがよく知られている。米国で製品化されている同種無細胞化真皮マトリックス、AlloDerm（登録商標、米国LifeCell社）は、1 M塩化ナトリウムとSDSで処理したものである（例えば、非特許文献7、8参照。）。しかし、界面活性剤であるSDSによる処理方法は、基底膜あるいは真皮にダメージを与える可能性がある。

【非特許文献1】Rheinwald JG & Green H : Serial cultivation of human epidermal keratinocytes : the Cell formation of keratinizing colonies from single cells. Cell. 1975;6:331-344

【非特許文献2】O' Connor NE, Mulliken JB, Banks-Schlegel S, et al : Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells . Lancet. 1981;1:75-78

【非特許文献3】Nanchahal J & Ward CM : New grafts for old? A review of alternatives to autologous skin. Brit J Plast Surg. 1992;45:354-363

【非特許文献4】Hansbrough JF., Morgan JL., Greenleaf GE., et al : Composite grafts of human keratinocytes grown on a polyglactin mesh cultured fibroblasts dermal substitute function as a bilayer skin replacement in full-thickness wounds on athymic mice. Burn Care Rehabil. 1993;14:485-494

【非特許文献5】Bell E., Ehrlich HP., Buttle DJ., et al : Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full-thickness. Science. 1981;211:1052-1054

【非特許文献6】Boyce ST., Christianson D., Hansbrough JF. : Structure of a collagen-GAG skin substitute optimized for cultured human epidermal keratinocytes. J Biomed Mater Res. 1988;22:939-957

【非特許文献7】Livesey SA, Herndon DN, Hollyoak MA, et al : Transplanted acellular allograft dermal matrix. Potential as a template for the reconstruction of viable dermis. Transplantation. 1995;60:1-9

【非特許文献8】Wainwright DJ. Use of an acellular dermal matrix(AlloDerm) in the management of full-thickness burns. Burns. 1995;21:243-248

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0006】

したがって、本発明は、培養皮膚としての担体に適したADMの作製法、つまり、基底膜をはじめとする種々の細胞外マトリックスを温存することができ、表皮層が容易に剥離され、かつ、真皮マトリックスにダメージを与えない分離無細胞化方法、当該分離無細胞化方法により得られる無細胞化真皮マトリックス、或いは当該分離無細胞化方法を利用した無細胞化真皮マトリックスの製造方法を提供することを目的とし、また当該無細胞化真皮マトリックスを担体とした複合培養皮膚をはじめとする複合培養上皮を提供することを目的とする。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0007】

本発明の発明者らは、培養皮膚としての担体に適したADMの作製法を検討し、1 M塩化ナトリウム処理に先立って、同種皮膚を凍結融解することにより、表皮層の剥離を容易に行うことができること、また、真皮内細胞の除去法として、PBSによる流水洗浄法が適していることを見出し、本発明を完成させるに至った。

#### 【0008】

従って、本発明は、採取した皮膚を凍結融解した後、高張食塩水で処理することにより表皮と真皮とに分離する工程、及び、分離した表皮を等張緩衝液で洗浄する工程を含むこ

とを特徴とする皮膚の分離無細胞化方法である。

【0009】

また、本発明は、採取した皮膚を凍結融解した後、高張食塩水で処理することにより表皮と真皮とに分離する工程、及び、分離した表皮を等張緩衝液で洗浄する工程により分離し、無細胞化したことを特徴とする無細胞化真皮マトリックスである。

【0010】

また、本発明は、採取した皮膚を凍結融解した後、高張食塩水で処理することにより表皮と真皮とに分離する工程、及び、分離した表皮を等張緩衝液で洗浄する工程を含むことを特徴とする無細胞化真皮マトリックスの製造方法である。

【0011】

また、本発明は、上記無細胞化真皮マトリックスを基質とする複合培養皮膚である。

【0012】

さらに、本発明は、上記無細胞化真皮マトリックスを基質とする複合培養上皮である。

【発明の効果】

【0013】

本発明の無細胞化真皮マトリックスの製造法は、真皮に基底膜を残した状態で、表皮を容易に剥離することが可能であり、さらに正常の真皮マトリックス構造を保持しながら、確実に無細胞化できる、優れた方法である。本発明の方法によって作成したヒト同種無細胞化真皮マトリックスは、組織再生医療や培養組織を用いた研究のための、培養上皮組織に最適なマトリックス（担体）、つまり、培養細胞の接着や培養細胞の重層化に最適なマトリックスとして使用することが可能である。また、本発明の無細胞化真皮マトリックスは、皮膚のみならず、粘膜、腸管上皮の培養組織の担体とすることも可能であり、広く上皮組織一般に応用されるものである。さらに、本発明の無細胞化マトリックスを用いた複合培養皮膚は、動物のコラーゲンマトリックス、従来のADM及びバイクリル等の人工物からなる担体を使用したものに比べ、培養細胞を重層化した後の接着性、培養組織としての安定性等に優れ、臨床的にも使用することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

ヒト同種皮膚は、細胞成分や生理的皮膚構造を有することから最も優れた創傷被覆材であるが、同種の細胞を含むため移植後数週間以内に免疫学的拒絶反応により表皮細胞層が脱落してしまう。そこですべての細胞を除去することで免疫学的拒絶を抑制し永久生着を可能としたものが、無細胞真皮マトリックス（Acellular Dermal Matrix: ADM）である。

【0015】

皮膚組織の分離無細胞化には様々な方法が報告されている。1972年にOliverらはトリプシンによるタンパク質分解酵素処理によってブタ皮膚を無細胞化した（Oliver RF., Grant RA, and Kent CM.: The fate of cutaneously and subcutaneously implanted trypsin purified dermal collagen in the pig. Br J exp Path. 1972;53:540-549）。1987年にGrinnelらは皮膚の凍結融解を行い、その後ピンセットを用いて真皮から表皮を剥離する物理的方法により皮膚の分離無細胞化を行った（Grinnel F., Toda K., and Lamke-Seymour C.: Reconstruction of human epidermis in vitro is accompanied by transient activation of basai keratinocyte spreading. Exp Cell Res. 1987;172:439-449）。また、Sasamotoらは1990年にデイスパーゼ処理によりラット皮膚のADMを作製した（Sasamoto Y., Alexamder JW., and Babcock GF.: Prolonged survival of reconstituted skin grafts without immunosuppression. J Burn Care Rehabil. 1990;11:190-200）。

【0016】

本発明の分離無細胞化方法と関連する方法としては、Takamiらが1996年にデイスパーゼとデタージェントであるTriton X-100を組み合わせた無細胞化法を報告した（Takami Y., Matuda T., Yoshitake M., et al.: Disperse/detergent treated



dermal matrix as a dermal substitute. Burns. 1996;22:182-190)。また、AlloDerm (登録商標、米国 Life Cell 社) は、1M 塩化ナトリウムにより表皮層を剥離した後、デタージェントである SDS を用いて真皮内残存細胞を溶解除去したものである (Livesey SA, Herndon DN, Hollyoak MA, et al : Transplanted acellular allograft dermal matrix. Potential as a template for the reconstruction of viable dermis. Transplantation. 1995;60:1-9; Wainwright DJ. Use of an acellular dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns. Burns. 1995;21:243-248)。上記の凍結融解を行う物理的方法は、真皮内細胞を完全に除去するのが難しく、さらに過度の凍結融解やピンセットによる物理的な表皮剥離によって、真皮コラーゲンや基底膜構造が破壊されてしまう。また、トリプシンやディスパーゼといったタンパク質分解酵素を用いた化学的方法は、基底膜のみならずコラーゲン繊維から成る真皮組織を変性あるいは分解する作用があるため、無細胞化にはその処理時間が重要である。これに対し 1M 塩化ナトリウムによる処理は、基底膜や真皮組織を完全に温存させることができるが、さらに真皮内残存細胞を除去する必要がある。

#### 【0017】

真皮内細胞の除去には SDS や T t i t o n X-100 といったデタージェントを用いる方法の他に、PBS で洗浄除去する方法も報告されている。Marshallらは 1M 塩化ナトリウム処理の後、真皮部分を PBS で 4～8 週間もの長期間洗浄することにより基底膜温存型の ADM を作製した (Marshall L., Ghosh MM., Boyce SG., et al. : Effect of glycerol on intracellular virus survival ; Implications for the clinical use of glycerol-preserved cadaver skin. Burns. 1995;21:356-361)。デタージェント処理では短時間で基底膜を保持した ADM を作製できるが、化学成分を用いることから真皮マトリックスに何らかのダメージが生じる可能性がある。Walterらは、塩化ナトリウム、次いで SDS で作製した ADM が、通常の皮膚組織と比べて基底膜をはじめとした種々の細胞外マトリックスが減少していることを示している (Walter RJ., Matsuda T., Reyes HM., et al : Characterization of acellular dermal matrices (ADMs) prepared by two different methods. Burns. 1998;24:104-113)。ただし、それが塩化ナトリウムによるものなのか SDS によるものなのかについては明らかにされていない。しかし、後述の実施例では、塩化ナトリウム処理の後に PBS 処理した ADM に比べて、SDS 処理した ADM では基底膜あるいは真皮内血管基底成分の減少がみられた。すなわち、細胞外マトリックスの減少が、SDS によるものであることが明らかになった。

#### 【0018】

生体の皮膚では基底膜の破綻が水泡症など様々な疾患を惹起することから、基底膜の重要性についていくつもの報告があるが (Yancey KB. : Adhesion molecules. II : Interactions of keratinocytes with epidermal basement membrane. J Invest Dermatol. 1995;104:1008-1014)、複合型培養皮膚においてもその重要性は例外ではない。基底膜は緻密板 (lamina densa)、透明板 (lamina lucida)、線維細胞網板 (fibroreticular lamina) の 3 層構造から成り、IV 型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、ヘパラン硫酸、エンタクチンが主成分であり、そしてヘミデスモソーム (hemidesmosome) やアンカリングフィブリル (anchoring fibril) といった接着繊維とともに、表皮細胞と真皮との接着を強めている。また、基底膜は表皮細胞との接着を強固にするだけでなく、物質透過に対する障壁効果や表皮細胞の配列や分化を調節する機能を有している。培養皮膚としての担体を目的とした ADM には、これらの基底膜構造を完全に温存させることが望ましいと考えられよう。

#### 【0019】

Ojehらは基底膜温存型の ADM と C-GAG に表皮細胞を播種し表皮層形成の比較をしたところ、ADM のほうが表皮層形成程度が良好であったことを示している (Ojeh. N.O., Frame. J.D., F.R.C.S., et al : In vitro characterization of an Artificial dermal scaffold. Tissue Engineering. 2001;7:457-472)。また、Ralstonらは基底

膜温存型のADMは非温存型のADMよりも、表皮細胞の接着や表皮層形成程度が高いことを報告した(Ralston DR, Layton C, Dalley AJ, et al : The requirement for basement membrane antigens in the production of human epidermal/dermal composites in vitro. British Journal of Dermatology 1999;140:605-615)。後述する実施例では基底膜の温存程度の違いによる表皮層形成には顕著な差はみられなかったが、表皮層の接着性には明らかな差がみられた。また、表皮細胞による基底膜の新規形成は認められなかった。これらの結果から、培養皮膚の担体としてのADM作製法には基底膜成分を温存できる1M塩化ナトリウムを用いる方法が適しており、真皮内細胞の除去にはPBS洗浄による方法が基底膜温存の安定性が高いことが明らかとなった。

#### 【0020】

さらに、ADMに線維芽細胞および表皮細胞を組み込んだ複合型培養皮膚は、1997年にGhoshらが報告したが(Ghosh MM, Boyce S, Layton C, et al: A Comparison of Methodologies for the Preparation of human Epidermal-Dermal Composites. Annals of Plastic Surgery. 1997;39:390-404)、その後現在に至るまで、同様の研究は同種皮膚の無細胞化法、ADMの滅菌法、培養細胞の組み込み法などに焦点が当てられており(Manimalha Balasubramani, T Ravi Kumar, Mary Babu : Skin substitutes: a review. Burns. 2001;27:534-544)、現在、ADMに表皮細胞(keratinocyte)を組み込んだ培養皮膚の生体への移植報告について確認されているものは、Chakrabartyらによるヌードマウスを用いた例のみである(Chakrabarty KH, Dawson RA, Harris P, et al : Development of autologous human dermal-epidermal composites based on sterilized human allodermis for clinical use. British Journal of Dermatology 1999;141:811-823)。また、培養上皮に関しても、泉らによるAlloDermに口腔粘膜細胞を組み込んだ培養上皮をマウスへ移植した報告があるのみである(Izumi K, Feinberg SE, Terashi H, et al : Evaluation of transplanted tissue-engineered oral mucosa equivalents in severe combined immunodeficient mice. Tissue Eng. 2003;9:163-174)。つまり、複合型培養皮膚の臨床的完全移植例は、今回、本発明の発明者らが初めて成し得たものである。また、本ADMは口腔粘膜上皮細胞や小腸上皮細胞との親和性が認められたことから、皮膚だけでなく様々な上皮細胞を用いた組織再生医療への応用も期待される。

#### 【0021】

以下、本発明の分離無細胞化方法について説明する。本発明の分離無細胞化方法は、ヒトを含む同種哺乳動物から採取された皮膚を用いて、基底膜等をはじめとする細胞外マトリックスを真皮に温存させた状態で当該皮膚の表皮と真皮とを分離し、さらに、分離した真皮を無細胞化する方法である。ここで、本発明に用いられる同種哺乳動物から採取された皮膚とは、熱傷の治療等として植皮等の処置が必要なヒトその他の動物と同種の動物から採取された皮膚であり、同種の動物由来であれば自家であるか否かは問わない。手術後若しくは同種皮膚採取後に不要となった余剰皮膚、或いは死体より得られる皮膚等も利用可能であり、またスキンバンク等に凍結保存されている皮膚も用いることができる。当該皮膚は、平均0.38mm厚(平均約0.015インチ厚)程度の分層皮膚として使用するのが好適である。

#### 【0022】

本発明において、採取した皮膚の表皮と真皮への分離は、採取した皮膚を、凍結融解する工程、高張食塩水で処理する工程により行われる。この処理により、基底膜等をはじめとする細胞外マトリックスが真皮に残された状態で、表皮と真皮とを容易に分離することができる。

#### 【0023】

凍結融解する工程において、凍結は採取した皮膚を好ましくは-20℃以下、さらに好ましくは-20~-80℃の温度で24~48時間、次いで好ましくは液体窒素を用い-190℃以下、さらに好ましくは-190~-200℃の温度で保持することにより行われる。保持する時間に特に限定はなく、好ましくは48時間以上であり、半永久的に保持

することが可能である。融解は凍結した皮膚を20～37℃の温度で5分以上、好ましくは5～10分保持することにより行われることが好ましい。

#### 【0024】

また、本発明において、高張食塩水とは、好ましくは0.8～2.0M、さらに好ましくは0.9～1.5M、最も好ましくは0.9～1.1Mの塩化ナトリウム水溶液である。高張食塩水は、任意に、他の付加的成分、例えばビタミン、保存料、抗生物質等を含み得る。

#### 【0025】

高張食塩水による処理とは、当該高張食塩水に皮膚を浸漬することを含み、好ましくは当該混合溶液への浸漬及び当該混合溶液中での震盪を含む。浸漬・震盪の温度は、処理される皮膚の実質的な変性が発生しない温度であればよく、一般的には20～37℃で行なわれるがこれに限定されない。処理時間は、8～12時間程度で充分であるが、分離の状況を勘案して、より短くすることもでき、また若干長めに設定してもよい。

#### 【0026】

本発明における分離工程は、皮膚を高張食塩水処理する前に凍結融解処理を加えることにより表皮層剥離時間を短縮することが可能であり、本工程により、ヒトを含む同種哺乳動物から採取された皮膚は、基底膜が真皮に温存された状態で、真皮コラーゲンや基底膜構造が破壊されることなく真皮と表皮とが完全に分離される。

#### 【0027】

次いで、得られた真皮は、等張緩衝液で洗浄する工程により無細胞化される。本工程は、トランズウェル (TransWell, Cat No. 3403: 登録商標、CORNING社製) などのデバイスに代表される三次元培養が可能なカルチャーインサートシャーレを用いて、分離された真皮を透過性のある膜上に置き、真皮上部、つまり、基底膜側から等張緩衝液を持続的に流すことにより真皮内細胞を物理的に除去する工程である。トランズウェルのようなデバイスは、分離された真皮に対し、流動的にPBSを流しかけることができるため好ましく使用される。等張食塩水としては、いずれのものを使用しても良く、本発明においては、PBS (Phosphate Buffered Saline: リン酸緩衝化生理食塩水) が好ましく用いられる。等張緩衝液は、任意に、他の付加的成分、例えばビタミン、保存料、抗生物質等を含み得る。

#### 【0028】

洗浄時の等張緩衝液を流す方法は、ピペット操作により真皮が液中に完全に浸漬するまで真皮表面に等張緩衝液を直接流しかけ、その後、さらに真皮が液中に完全に浸漬した状態で真皮表面に等張緩衝液を流しかけることが好ましい。等張緩衝液の流量は、シャーレとして100mmシャーレを用いた場合、10～30ml/5～10秒であることが好ましく、15～30ml/5～10秒であることがより好ましく、15～25ml/5～10秒であることが特に好ましい。洗浄時の温度は、洗浄される真皮の実質的な変性が発生しない温度であればよく、一般的には20～37℃で行なわれるがこれに限定されない。洗浄時間は、1週間程度で充分であるが、無細胞化の状況を勘案して、より短くすることもでき、また若干長めに設定してもよい。

#### 【0029】

本発明における無細胞化工程は、真皮に等張緩衝液を流しかける方法によるものであり、この流水法により細胞の除去に要する期間を短縮することが可能であり、本工程により、正常の真皮マトリックス構造を保持しながら、確実に無細胞化した真皮マトリックスを得ることができる。

#### 【0030】

好適な分離無細胞化方法の具体例においては、同種哺乳動物から採取された皮膚を、凍結 (温度-80℃、24時間、次いで液体窒素を用いて温度-196℃、48時間)、融解 (温度37℃、5分) した後、1M塩化ナトリウムに皮膚を浸し、37℃、12時間震盪し、基底膜が真皮に温存された状態で真皮と表皮とを分離する。次いで、分離された真皮部分を、トランズウェルを用いて上部からPBSを流すことにより、37℃、1週間、

持続洗浄する。この処理により実質的に真皮内の全ての細胞成分（皮膚付属器の細胞、血管系の細胞、線維芽細胞、神経系の細胞、その他）が除去され、真皮は基底膜が温存されたコラーゲン主体の真皮マトリックスとなる。

#### 【0031】

かくして無細胞化された真皮（マトリックス）は、そのまま本発明の無細胞化真皮マトリックスとして利用することもでき、また、これを冷蔵保存して使用することもできる。

#### 【0032】

また、好ましくは、上記により得られた無細胞化真皮マトリックスに関し、当該真皮マトリックスの一部を細菌・真菌培養し、細菌・真菌の発育のないことを確認する。より好ましくは、ヘマトキシリン・エオシン染色による病理学的検査により、実質的に真皮コラーゲン構造に異常が無い事と実質的に完全に無細胞であることを確認する。更に好ましくは、免疫化学的染色により、I V型コラーゲン及びラミニンの存在を確認することにより、実質的に基底膜が温存されていることを確認する。

#### 【0033】

上記の無細胞化方法／無細胞化真皮マトリックス製造方法は、従来法に比べ、基底膜等の細胞外マトリックスが温存され、正常の真皮マトリックス構造を保持しながら、確実に無細胞化できる、優れた方法である。

#### 【0034】

上記により製造した無細胞化真皮マトリックスは、基底膜等の細胞外マトリックスが温存され、実質的に無細胞であり、かつ正常の真皮内コラーゲン構造の損傷は極めて少なく、3次元的な真皮内コラーゲン構造を保持されている。

#### 【0035】

また、本発明において、当該無細胞化真皮マトリックスは、ヒト同種無細胞化真皮マトリックスとして、異種コラーゲンマトリックスに代わる移植可能な複合培養皮膚の担体として使用し得る。

#### 【0036】

さらに、本発明の無細胞化真皮マトリックスを担体として、培養口腔粘膜上皮細胞又は培養上皮細胞を組み込んだ、皮膚以外の培養組織を得ることもできる。

#### 【実施例】

#### 【0037】

以下に、実施例により本発明を更に詳しく説明するが、本発明が当該実施例にのみ限定されるものではないことは言うまでもない。

#### 【0038】

##### [実施例1]

本発明の無細胞化真皮マトリックスの製造方法の特徴と利点を検討するために、従来報告されている分離無細胞化の方法との比較検討を行った。

#### 【0039】

##### (1) 方法1 (1M NaCl+PBS)

手術時あるいは同種皮膚採取後に不要となった余剰皮膚（分層皮膚：平均約0.38mm厚：0.015インチ厚）を、液体窒素を用いて凍結（温度-80℃、24時間、次いで温度-196℃、48時間）、融解（温度37℃、5分）した後、1M NaClに浸し、37℃、12時間インキュベートした。この処理により、表皮と真皮は、真皮に基底膜が残った状態で容易に分離にされた。

#### 【0040】

得られた真皮部分を、トランズウェルを用いてPBS（37℃）で1週間、持続洗浄した。この処理により真皮内の全ての細胞成分（皮膚付属器の細胞、血管系の細胞、線維芽細胞、神経系の細胞、その他）が除去され、真皮は基底膜が温存されたコラーゲン主体の真皮マトリックスとなった。

#### 【0041】

## (2) 方法2 (1M NaCl+Triton X-100)

余剰皮膚を、液体窒素を用いて凍結、融解後、1M NaClとデタージェントである Triton X-100 (商品名) を、順次、用いる方法。すなわち、分層皮膚を表皮と真皮に分離する際には、凍結融解に続いて1M NaCl処理を行い、分離した真皮の無細胞化処理においてはTriton X-100によって処理を行う方法。

## 【0042】

## (3) 方法3 (1M NaCl+SDS)

余剰皮膚を、液体窒素を用いて凍結、融解後、1M NaClとデタージェントである SDS (Sodium Dodecyl Sulfate: ドデシル硫酸ナトリウム) を、順次、用いる方法。すなわち、分層皮膚を表皮と真皮に分離する際には、凍結融解に続いて1M NaCl処理を行い、分離した真皮の無細胞化処理においてはSDSによって処理を行う方法。

## 【0043】

## (4) 方法4 (ディスパーゼ)

余剰皮膚を、液体窒素を用いて凍結、融解後、分層皮膚を表皮と真皮に分離する際に、タンパク質分解酵素であるディスパーゼのみを用いる方法。

## 【0044】

## (5) 方法5 (トリプシン+Triton X-100)

余剰皮膚を、液体窒素を用いて凍結、融解後、タンパク質分解酵素であるトリプシンとデタージェントであるTriton X-100 (商品名) を、順次、用いる方法。すなわち、分層皮膚を表皮と真皮に分離する際には、凍結融解に続いてトリプシン処理を行い、分離した真皮の無細胞化処理においてはTriton X-100によって処理を行う方法。

## 【0045】

上記5種類の方法により得たADMの性状を確認した。図1は、HE染色後のヒト同種皮膚、及び、方法1～5により得たADMの断面写真である。ヒト同種皮膚の断面写真において、青紫色に染色されている部分は、表皮細胞又は真皮線維芽細胞の細胞核である。ヒト同種皮膚においては、表皮層及び真皮線維芽細胞が確認できた。一方、方法1～5により得たADMの全てにおいては表皮層が剥離され、また、真皮線維芽細胞が除去されていることが確認できた。つまり、得られたADMは、それぞれ完全に無細胞化していた(図1、表1)。

## 【0046】

また、基底膜成分であるIV型コラーゲン及びラミニンを免疫化学的に染色し、基底膜の温存の程度を確認した。図2及び図3は、免疫化学的染色後の方法1～5により得たADMの断面写真であり、茶褐色に染色された部分がIV型コラーゲン又はラミニンである。図2及び図3において、方法1及び2により得たADMでは茶褐色に強く染色された部分が多数見られ、方法3により得たADMは染色された部分が若干見られ、方法4及び5により得たADMは染色された部分が見られなかった。つまり、方法1、2及び3の1M NaClを用いて表皮剥離処理を行ったADMで、基底膜の温存が確認された(図2及び図3、表1)。その中でも、方法1により得たADMにおいて最も高い温存が確認された。これに対し、方法4及び5によるタンパク質分解酵素処理を行ったADMでは、基底膜が殆ど分解されていた。

## 【0047】

【表1】

Method	Temperature/ Time	Cell Removal	TypeIV Collagen	Laminin
① 凍結融解 +1M NaCl +PBS	※1 37°C/12hrs 37°C/1weeks	good	+++	++
② 凍結融解 +1M NaCl +TritonX-100	※1 37°C/12hrs 37°C/4 hr	good	+++	++
③ 凍結融解 +1M NaCl +SDS	※1 37°C/12hrs 37°C/1 hr	good	++	+
④ 凍結融解 +ディスパーゼ	※1 37°C/12hrs	good	—	—
⑤ 凍結融解 +トリプシン +TrironX-100	※1 37°C/4hrs 37°C/4hrs	good	—	—

※1 -80°C/24h+-196°C/48h+37°C/5min

## 表1 各種ADMの特性

【0048】

なお、表1において、評価は視覚的観察によるものであり、各評価項目の判定基準は下記の通りである。

<細胞の除去 (Cell Removal)>

good: ADMから細胞が完全に除去された。

<IV型コラーゲン (Type IV Collagen)>

+++ : IV型コラーゲンが基底膜部および真皮内において最も強く染色された。

++ : IV型コラーゲンが基底膜部のみにおいて染色された。

— : IV型コラーゲンが基底膜部および真皮内において染色されなかった。

<ラミニン (Laminin)>

++ : ラミニンが基底膜部および真皮内において強く染色された。

— : ラミニンが基底膜部の一部において染色された。

— : ラミニンが基底膜部および真皮内において染色されなかった。

【0049】

[実施例2]

図4に従い、実施例1で得られた各ADMに線維芽細胞、次いで、表皮細胞を播種し、1週間気相培養することにより表皮細胞を重層化させ、複合型培養皮膚を得た。

【0050】

HE染色を行うことにより得られた各複合型培養皮膚の性状を確認した。図5は、HE染色後の各複合型培養皮膚の断面写真である。方法1により得たADMを担体とした複合型培養皮膚は、表皮細胞が十分に重層化しており、また、表皮細胞とADMとの間での剥離が見られず接着性が良好であった。方法2及び3により得たADMを担体とした複合型培養皮膚は、表皮細胞の重層化の程度がやや低いが、表皮細胞とADMとの間での剥離は見られず接着性は良好であった。方法4により得たADMを担体とした複合型培養皮膚は、表皮細胞の重層化の程度がやや低く、また、表皮細胞とADMとの間で剥離が見られた。方法5により得たADMを担体とした複合型培養皮膚は、表皮細胞の重層化は良好であったが、表皮細胞とADMとの間で完全に剥離していた。つまり、各ADMに播種した表皮細胞は、すべての試験区において表皮細胞が重層化し、角質層が形成された。また、ADMへの表皮細胞の接着性の評価においては、方法1、2及び3の1M NaClを用いた基底膜温存型のADMでは、全ての試験区においてADMと表皮層との接着が確認された。これに対し、方法4によるデイスパーゼ、及び、方法5によるトリプシン処理により得たADMでは、表皮細胞層とADMとの接着力が脆弱であり、表皮層とADMとの間で剥離が見られ、接着しなかった。

#### 【0051】

さらに、方法1～5により得た複合型培養皮膚を免疫化学的に染色し、IV型コラーゲンの存在を確認した。図6は、免疫化学的染色後の各複合型培養皮膚の断面写真である。方法1～3により得たADMを担体とした複合型培養皮膚において、IV型コラーゲンの染色が確認されたが、方法4及び5により得たADMを担体とした複合型培養皮膚においては、IV型コラーゲンの染色が確認されなかった。つまり、表皮細胞による基底膜構造の新規構築は見られなかった(図6)。本発明の分離無細胞化方法により作成したADMは、表皮細胞重層化後の接着性、培養組織としての安定性に優れたものであった。

#### 【0052】

##### [実施例3]

図4に従い、本発明の複合型培養皮膚と、従来から開発されている担体を用いた複合型培養皮膚とに線維芽細胞、次いで、表皮細胞を播種し、1週間気相培養することにより表皮細胞を重層化させ、複合型培養皮膚を得た。なお、表2中、従来のADMとは、具体的に従来の方法とは凍結融解による物理的方法やトリプシン、デイスパーゼなどのタンパク質分解酵素、あるいはSDSやTriton X100などのデタージェントを用いた化学的方法により得られたADMをいう。

#### 【0053】

次いで、得られた複合型培養皮膚をHE染色し観察することにより、表皮細胞重層化後の接着性、培養組織としての安定性の比較を行った。

#### 【0054】

本発明の複合型培養皮膚が最も優れた重層化表皮層の接着性を示した(表2)。本発明の複合型培養皮膚は、従来の担体を使用したものに比べ、表皮細胞重層化後の接着性、培養組織としての安定性に優れたものであった。

#### 【0055】

【表 2】

	基底膜	表皮細胞 の接着性	重層化表皮層 の接着性	重層化
バイクリルなどの 人工物	—	+	+	+
動物のコラーゲン マトリックス	—	++	++	+
従来のADM	— or +	— ~ ++	— ~ ++	+
本発明による ADM	+	++	+++	+

表2 ADMと従来の担体との比較

## 【0056】

なお、表2において、各評価項目の判定基準は下記の通りである。

## &lt;基底膜&gt;

＋：基底膜がADM自体に残存していた。

－：基底膜が残存していなかった。

## &lt;表皮細胞の接着性&gt;

++：担体に表皮細胞が接着し易かった。

＋：担体に表皮細胞が接着し難かった。

－：担体に表皮細胞が接着しなかった。

## &lt;重層化表皮層の接着性&gt;

+++：担体に重層化表皮層が強く接着していた。

++：担体に重層化表皮層が接着していた。

＋：担体に重層化表皮層が接着していたが、接着力が弱かった。

－：担体に重層化表皮層が接着しなかった。

## &lt;重層化&gt;

＋：気相培養により担体への表皮細胞の重層化が観察された。

## 【0057】



## [実施例 4]

重症熱傷例の創部の一部に本発明の複合型培養皮膚を HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution: ハンクスの平衡塩類溶液) で 3 回洗浄した後、1 時間以内に患部に移植した。移植枚数は 4 枚でそれぞれ 5 × 5 cm であった。移植方法はピンセットでシャーレから無菌的に培養皮膚を取り出し、表皮面を上にして患部に移植した。移植後 22 日の所見では培養皮膚は完全に生着し、表皮が形成された (図 7)。移植後 13 日の培養皮膚の HE 染色像では移植床と培養皮膚の接着は良好で、培養皮膚真皮内に新生血管が形成され、表皮細胞は正常皮膚組織とほぼ同等の形態を有していた。

## 【0058】

## [実施例 5]

本発明の無細胞化真皮マトリックスを担体として、線維芽細胞は使用せずに培養口腔粘膜上皮細胞又は培養小腸上皮細胞を組み込んだ培養組織を 1 週間気相培養することにより得た。得られた培養組織を HE 染色することにより観察した。図 8 は、培養口腔粘膜組織の断面写真であり、口腔粘膜上皮細胞は ADM に接着し、重層化した。また、図 9 は、培養小腸組織の断面写真であり、小腸粘膜上皮細胞は ADM に接着し、重層化した。培養口腔粘膜組織、培養小腸組織ともに、接着性は良好であり、ADM は種々の細胞の担体として使用可能である。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0059】

【図 1】 ヒト同種皮膚及び方法 1～5 により得られた無細胞化真皮マトリックスの組織像 (HE 染色、倍率 100 倍) を示す図面代用写真。

【図 2】 方法 1～5 により得られた無細胞化真皮マトリックスにおける IV 型コラーゲンの染色像 (免疫染色、倍率 200 倍) を示す図面代用写真。

【図 3】 方法 1～5 により得られた無細胞化真皮マトリックスにおけるラミニンの染色像 (免疫染色、倍率 200 倍) を示す図面代用写真。

【図 4】 無細胞化真皮マトリックスを担体とした複合型培養皮膚の作製法を示す概念図。

【図 5】 方法 1～5 により得られた無細胞化真皮マトリックスを担体とした複合型培養皮膚の組織像 (HE 染色、倍率 200 倍) を示す図面代用写真。

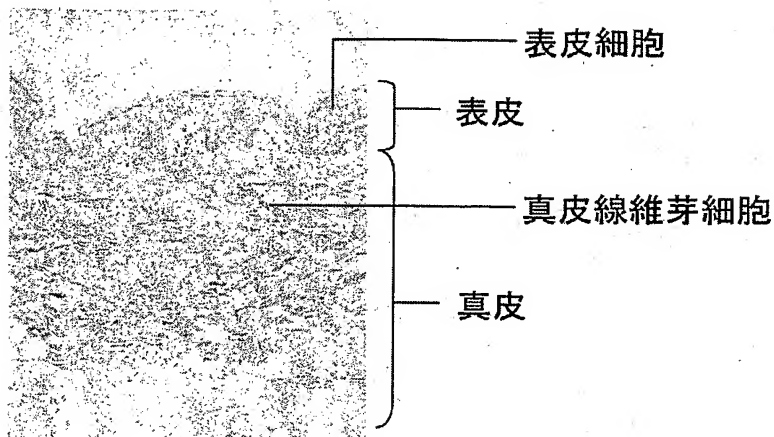
【図 6】 方法 1～5 により得られた無細胞化真皮マトリックスを担体とした複合型培養皮膚における IV 型コラーゲンの染色像 (免疫染色、倍率 200 倍) を示す図面代用写真。

【図 7】 本発明の複合型培養皮膚移植像 (移植直後及び 22 日目) を示す図面代用写真、及び、本発明の複合型培養皮膚移植後 (13 日目) の皮膚断面 (HE 染色、倍率 100 倍) を示す図面代用写真。

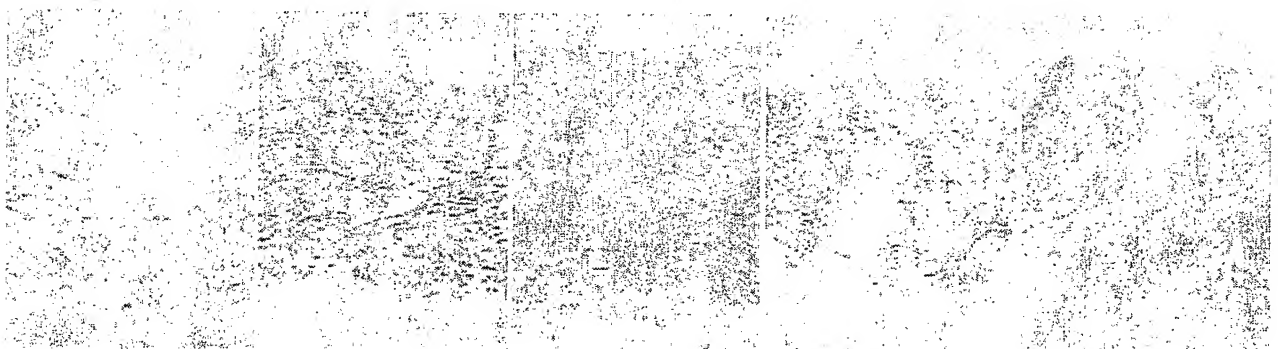
【図 8】 本発明の無細胞化真皮マトリックスを担体とした培養粘膜組織 (HE 染色、倍率 200 倍) を示す図面代用写真。

【図 9】 本発明の無細胞化真皮マトリックスを担体とした培養小腸組織 (HE 染色、倍率 200 倍) を示す図面代用写真。

【書類名】 図面  
【図 1】



ヒト同種皮膚



①  
凍結融解  
+1M NaCl  
+PBS

②  
凍結融解  
+1M NaCl  
+Triton  
X-100

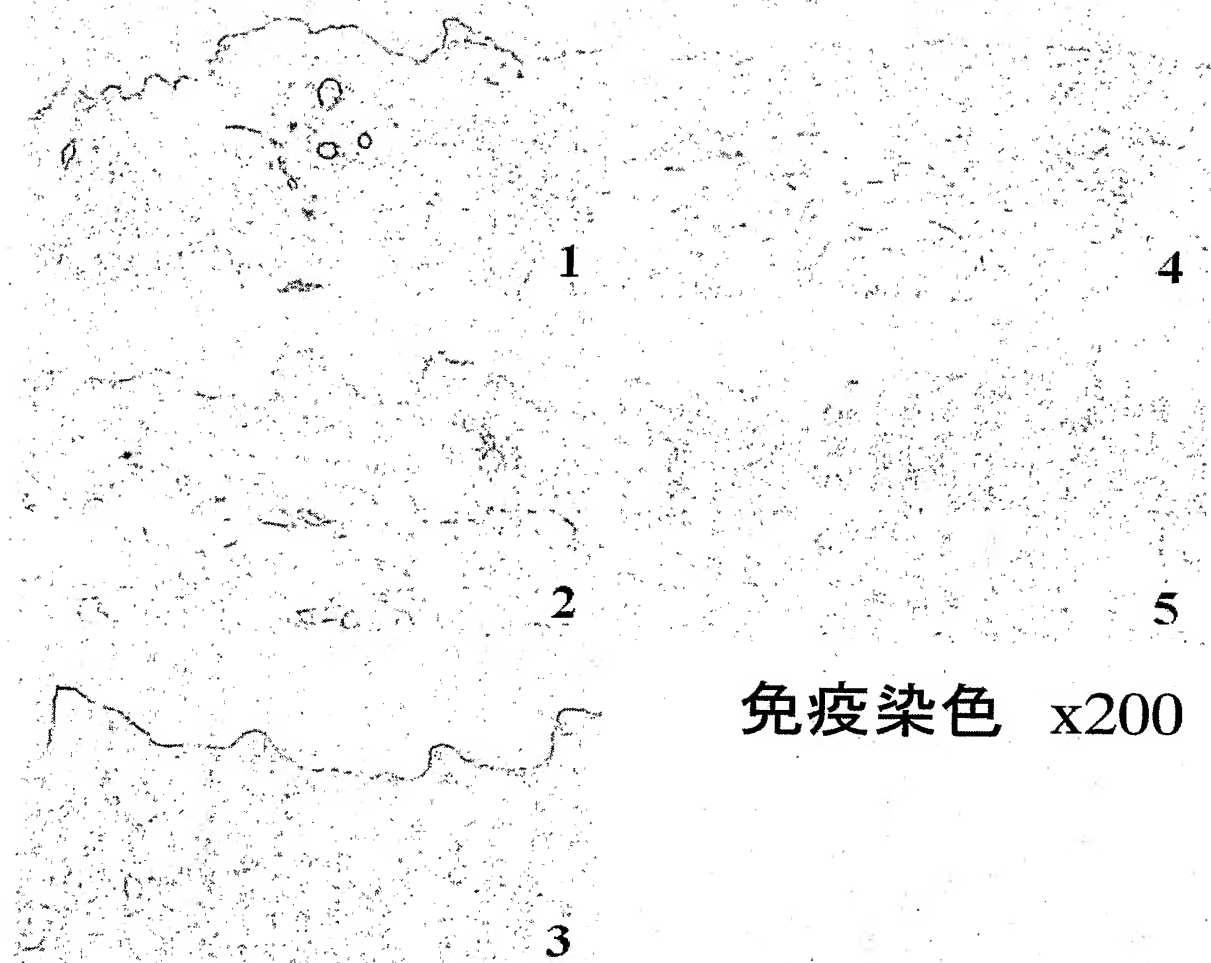
③  
凍結融解  
+1M NaCl  
+SDS

④  
凍結融解  
+デイスパーゼ

⑤  
凍結融解  
+トリプシン  
+Triton  
X-100

図1 ADMの組織像 H&E x100

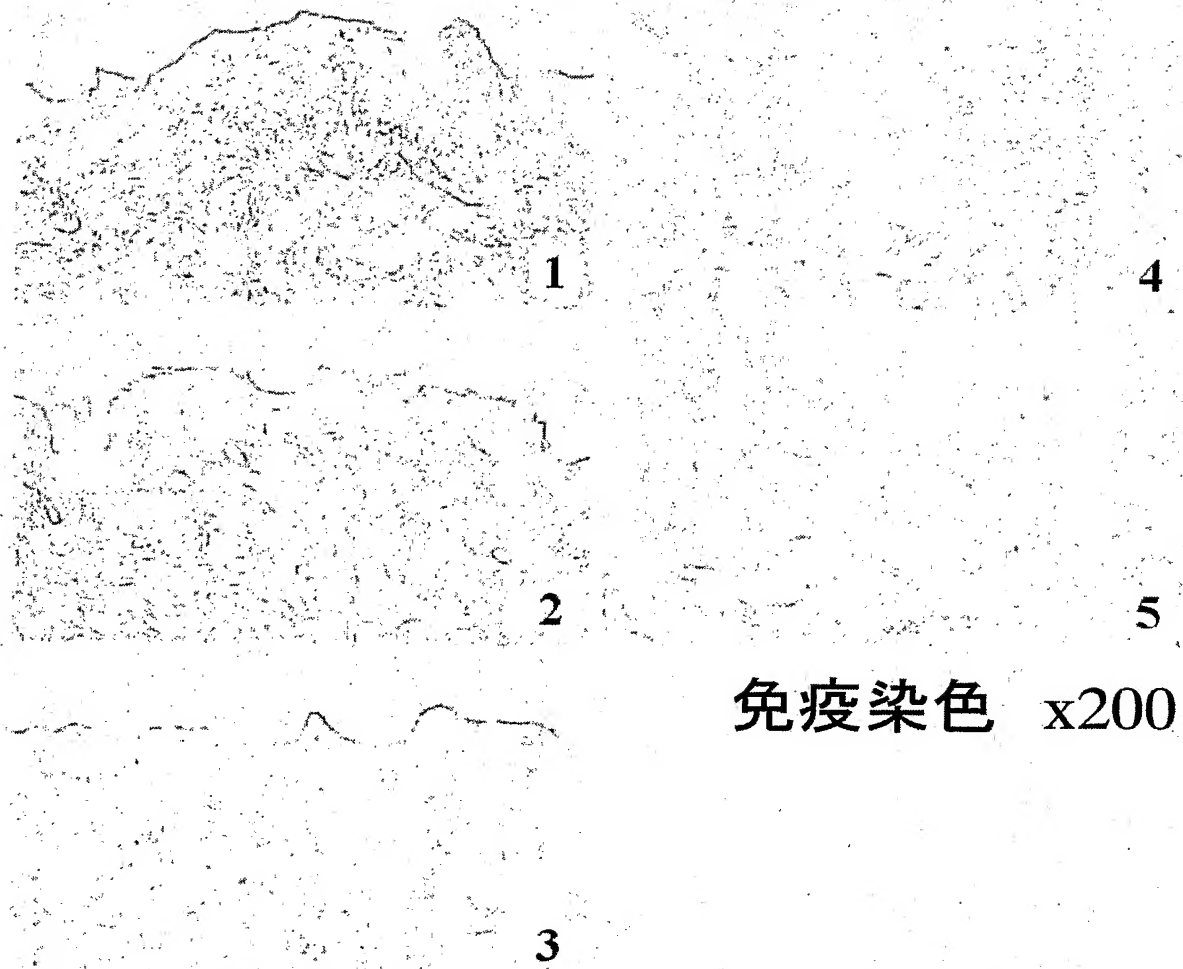
【図2】



- 1, 凍結融解+1MNaCl+PBS
- 2, 凍結融解+1MNaCl+TritonX-100
- 3, 凍結融解+1MNaCl+SDS
- 4, 凍結融解+Dispase
- 5, 凍結融解+Trypsin+TritonX-100

図2 ADMにおけるIV型コラーゲンの染色像

【図 3】



- 1, 凍結融解+1MNaCl+PBS
- 2, 凍結融解+1MNaCl+TritonX-100
- 3, 凍結融解+1MNaCl+SDS
- 4, 凍結融解+Dispase
- 5, 凍結融解+Trypsin+TritonX-100

図3 ADMにおけるラミニンの染色像

【図 4】

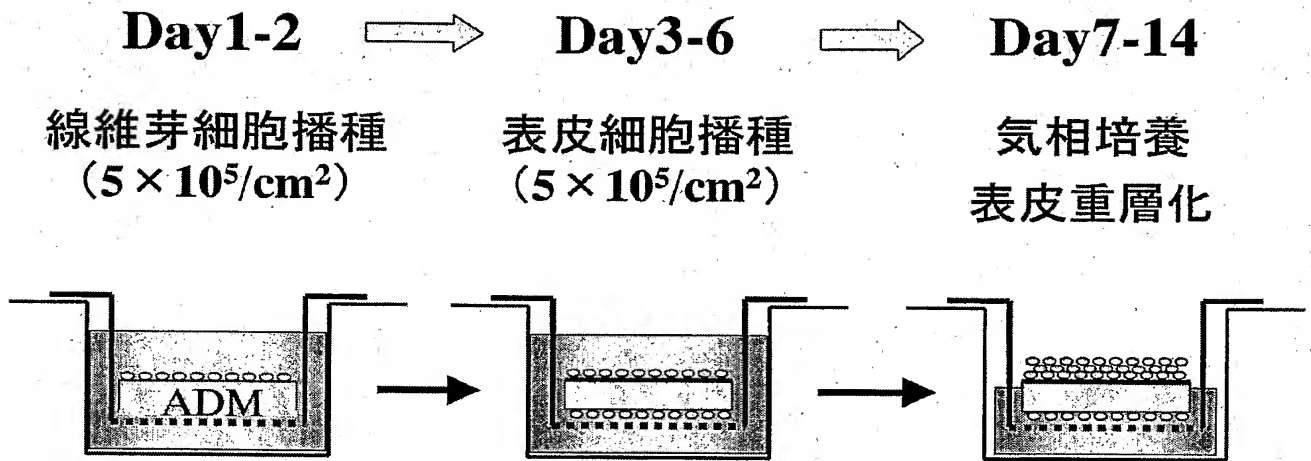
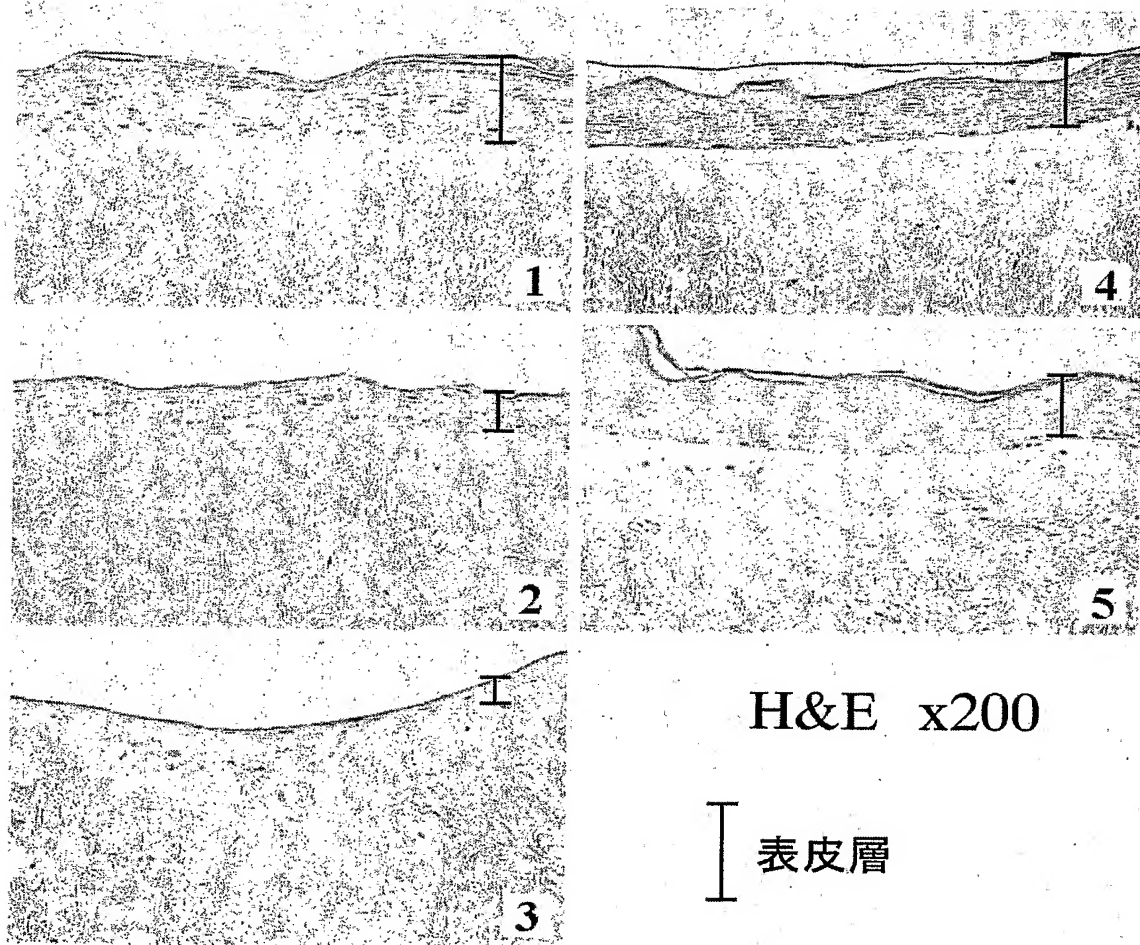


図4 ADMを担体とした複合型培養皮膚の作製法

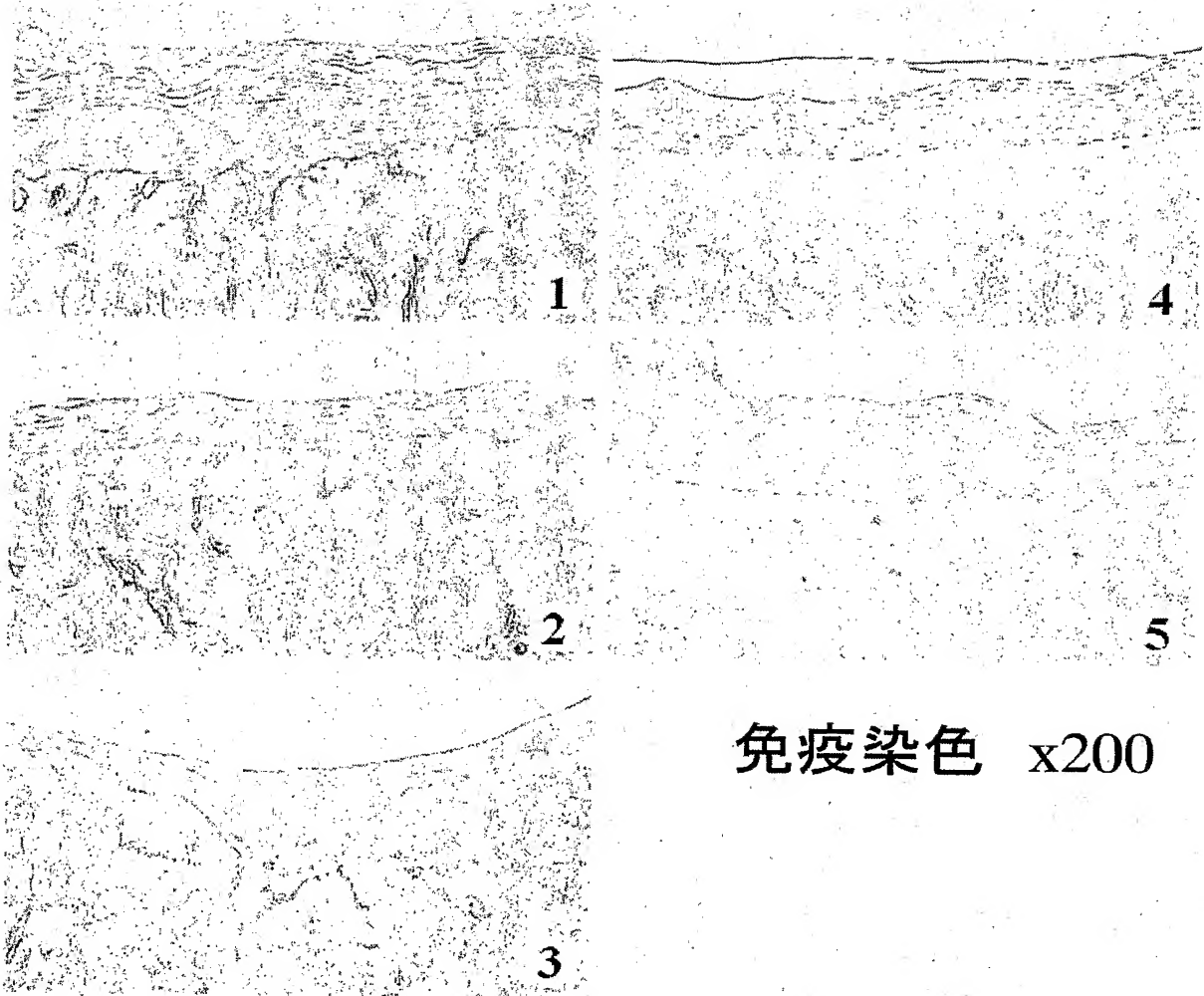
【図 5】



- 1, 凍結融解+1MNaCl+PBS  
2, 凍結融解+1MNaCl+TritonX-100  
3, 凍結融解+1MNaCl+SDS  
4, 凍結融解+Dispase  
5, 凍結融解+Trypsin+TritonX-100

図5 ADMを担体とした複合型培養皮膚の組織像

【図 6】

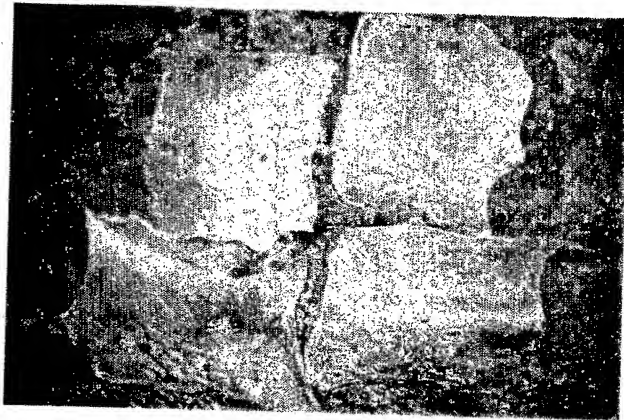


- 1, 凍結融解+1MNaCl+PBS
- 2, 凍結融解+1MNaCl+TritonX-100
- 3, 凍結融解+1MNaCl+SDS
- 4, 凍結融解+Dispase
- 5, 凍結融解+Trypsin+TritonX-100

図6 培養皮膚におけるIV型コラーゲンの染色像

【図7】

## 41歳女性 広範囲熱傷例



培養皮膚貼付直後



術後22日



培養皮膚

移植床

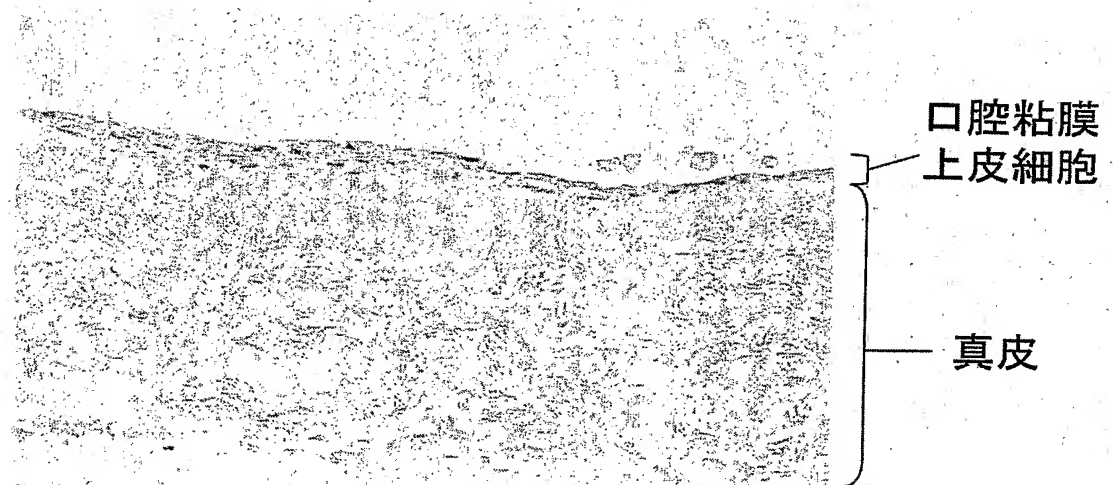
H&E x100

移植後13日目(組織像)

図7 ADMを担体とした複合型  
培養皮膚移植



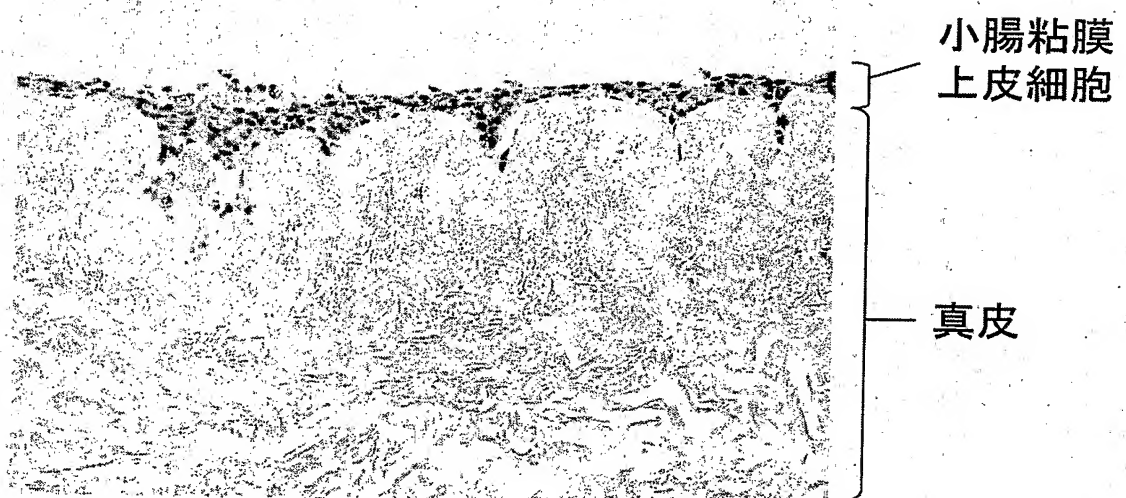
【図 8】



H&E x200

図8 ADMを担体とした培養粘膜組織

【図 9】



H&E x200

図9 ADMを担体とした培養小腸組織

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 培養皮膚としての担体に適したADMの作製法、つまり、基底膜をはじめとする種々の細胞外マトリックスを温存することができ、表皮層が容易に剥離され、かつ、真皮マトリックスにダメージを与えない分離無細胞化方法を提供すること。

【解決手段】 採取した皮膚を凍結融解した後、高張食塩水で処理することにより表皮と真皮とに分離する工程、及び、分離した表皮を等張緩衝液で洗浄する工程を含むことを特徴とする皮膚の分離無細胞化方法。

【選択図】 図 1

特願 2 0 0 3 - 4 3 0 4 9 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 0 2 3 4 4 0 8 6 ]

1. 変更新年月日

2 0 0 2 年 9 月 2 0 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都三鷹市新川 6 - 2 0 - 2 杏林大学医学部形成外科内

氏 名

高見 佳宏